

Zytotoxizitätstests mit in vivo
bzw. in vitro gegen MCAF
immunisierten Lymphozyten

von

Dieter Hölzl

aus

Nürnberg

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026



Aus dem Institut und Poliklinik für klinische Immunologie und Rheumatologie
der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Prof. Dr. Kalden

Zytotoxizitätstests mit in vivo
bzw. in vitro gegen MCAF
immunisierten Lymphozyten

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich - Alexander - Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Dieter Hölzl
aus
Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen - Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. V. Becker
Referent: Prof. Dr. H. Warnatz
Korreferent: Prof. Dr. J.R. Kalden
Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.1981

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	Seite 1
Methoden und Material	Seite 3
Tiere	Seite 3
Zelllinien	Seite 3
Antigenpräparation	Seite 4
Immunisierung der Mäuse	Seite 4
Effektorzellen	Seite 5
In vitro Immunisierung der Lymphozyten	Seite 6
Mikrozytotoxizitätstest	Seite 7
Ergebnisse	Seite 9
Diskussion	Seite 11
Abbildungen, Tabellen	Seite 13
Zusammenfassung	Seite 17
Literaturverzeichnis	Seite 19

Danksagung

Lebenslauf



Einleitung

Werden Mäuse gegen Methylcholanthren-induzierte Fibrosarkomzellen immunisiert, so kommt es bei einer nachfolgenden Transplantation von MCAF-Zellen zur Abstoßung oder zumindest zum verzögerten Wachstum der sich entwickelnden Tumoren (4). Parallel mit dieser Abwehrreaktion gegen die MCAF-Zellen wurde das Auftreten von zytotoxischen Lymphozyten in vitro nachgewiesen. T-Zellen der immunisierten Tiere zerstören MCAF-Zellen in der Gewebekultur (5,7,8, 11,14,17,18).

Die Induktion dieser Tumorabwehrmechanismen gelingt nach den bisher vorliegenden Literaturangaben (4) nur durch Immunisierung mit intakten Zellen. Dabei wurden verschiedene Prozeduren angewandt:

Es wurden Tumorzellen überpflanzt und die sich entwickelnden Tumoren wieder exzidiert. Es wurde mit Zellsuspensionen der Tumoren immunisiert, die zuvor letal bestrahlt wurden oder es wurden erhitzte MCAF-Zellen zur Immunisierung verwendet. Extrakte aus der Oberflächenmembran der Tumorzellen hatten in der Regel keinen immunisierenden Effekt; im Gegenteil wurde nach Immunisierung mit löslichen Extrakten häufig eine Beschleunigung des Tumorwachstums beobachtet, ein Phänomen, das nach Kalliss als Enhancement bezeichnet wird (1,3,10). In jüngsten Versuchen konnte nun gezeigt werden, daß bei Immunisierung mit insolubilisierten Extrakten es zu einer Induktion von Tumorabwehrmechanismen kommt, die zur Abstoßung von Tumortransplantaten bzw. zur wesentlichen Verlängerung der Überlebenszeit MCAF-tragender Tiere führt.

In den vorliegenden Untersuchungen sollte gezeigt werden, ob parallel mit der in vivo beobachteten Tumorabstoßung auch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) nachweisbar werden, die Spezifität gegen die extrahierten Tumorantigene zeigen.

Dazu wurden einerseits Lymphozyten von in vivo immunisierten Tieren untersucht, andererseits wurden Lymphozyten normaler Tiere in vitro immunisiert und ihre Zytotoxizität im Mikrozytotoxizitätstest nachgewiesen.

Neben partikulären Antigenen wurden folgende Antigene eingesetzt:

1. Aus MCAF-Tumorzellen extrahierte lösliche Oberflächenmembran-Proteine
2. Der obengenannte Antigenextrakt, jedoch vernetzt mit Glutaraldehyd und damit unlöslich gemacht

Das Ziel der Experimente war es festzustellen, ob Tumorabwehrmechanismen durch Immunisierung mit löslichen oder unlöslich gemachten Membranantigenen aus Tumorzellen ausgelöst werden können.

Methoden und Material

Tiere:

Für die Versuche wurden ausschließlich 6 bis 10 Wochen alte weibliche Mäuse verwendet. Die Tiere entstammten einer im eigenen Hause weitergezüchteten Linie des syngenen Stammes C 57 Bl 6 aus dem Zentralinstitut für Versuchstierzucht Hannover.

Zelllinien:

Die MCAF3-Zelllinie wurde ursprünglich durch subkutane Injektion von Methylcholanthren bei C 57 Bl 6 -Mäusen induziert (15). Zur Transplantation wurden die MCAF-Tumoren exzidiert, anschließend mit Pinzetten zerzupft und dann die Partikel für 30 Minuten in einer 0,25 %igen Kollagenaselösung bei 37° C suspendiert. Die isolierten Zellen wurden gewaschen, je 10^5 Zellen wurden in die Flanke nicht vorbehandelter Mäuse implantiert. Nach 7 bis 10 Tagen entwickelte sich ein kleiner Tumor, der in den folgenden Wochen bis zu 7 Gramm schwer wurde. Die Tiere starben nach 30 bis 35 Tagen an Tumorkachexie.

Die MCAF3-Zellen wuchsen in einschichtiger Gewebekultur in Plastikflaschen. Als Medium wurde hierbei RPMI 1640 mit 10 %igem fetalen Kälberserum verwendet. Die t_2 der Zellen betrug 19 Stunden. Durch Trypsinisation der Zellen erfolgte die Aufteilung der Kulturen zur Vermehrung und Weiterzucht. Als Kontrollzellen wurden Fibroblasten von C 57 Bl 6 -Mäusen verwendet.

Antigenpräparation:

Zellfreie MCAF3-Antigenextrakte aus syngennem Material wurden nach einer modifizierten Methode nach Meltzer et al. hergestellt. Zur Extraktion wurden 10^8 bis 10^9 lebende MCAF-Zellen in eine 3 M KCl-Lösung eingebracht, die mit 0,5 M Kaliumphosphatpuffer auf einen pH von 7,4 eingestellt war (12). Die Suspension wurde nach 24-stündiger Inkubationszeit eine Stunde lang bei 4° C und 40 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde gegen gepufferte 0,1 M Natriumchloridlösung dialysiert. Durch Membranfiltration wurde die Antigenpräparation sterilisiert. Der Eiweißgehalt wurde gemessen und auf 1 mg/ml eingestellt.

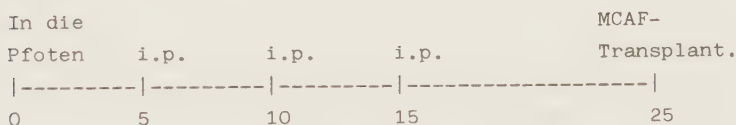
Unlösliches Antigen wurde nach der Methode von Avrameas et al. (2) durch Vernetzung des 3 M KCl-Extraktes hergestellt: zu 20 mg lyophilisiertem Extrakt, der in 0,5 ml 0,1 M Phosphatpuffer von pH 7,0 gelöst war, wurde unter dreistündigem ununterbrochenem Rühren 0,2 ml 2,5 %iger Glutaraldehyd zugegeben. Das Gel wurde mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator in 20 ml Phosphatpuffer homogenisiert. Die Suspension wurde 15 Minuten lang bei 3 000 Upm und 4° C zentrifugiert; diese Prozedur wurde zweimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Sediment lyophilisiert und bei -20° C aufbewahrt.

Immunisierung der Mäuse:

Eine erste Gruppe von Mäusen wurde mit kompletten, hitzebehandelten MCAF3-Zellen immunisiert. Diese Zellen waren durch Kollagenasebehandlung 3 bis 4 Wochen alter Tumoren gewonnen und die isolierten Zellen 30 Minuten lang bei 56° C inkubiert worden. Die zweite Gruppe wurde durch Injektion von 100 µg lyophilisiertem 3 M KCl-Extrakt aus MCAF3-Zellen immunisiert. Dasselbe Antigen, jedoch mit Glutaraldehyd vernetzt und damit unlöslich gemacht, wurde zur Immunisierung einer dritten Gruppe eingesetzt.

Die Tiere erhielten 10^6 erhitzte (56° C , 30 min) MCAF3-Zellen oder 100 μg löslichen bzw. unlöslichen Antigen-Extrakt in die vier Füße. Anschließend erhielten die Tiere drei intraperitoneale Injektionen mit 10^6 MCAF3-Zellen oder mit 100 μg löslichem bzw. unlöslichem Antigen-Extrakt in Zeitabständen von 5 Tagen:

Abb.1: Immunisierungsplan



Die Kontrollgruppen erhielten erhitzte Fibroblasten (56° C , 30 min) oder Extrakte aus Fibroblasten.

Die immunisierten und die Kontrolltiere wurden 10 Tage nach der letzten Antigen-Injektion getötet. Zur Präparation der Effektorzellen wurden Lymphknoten und die Milz entfernt.

Effektorzellen:

Effektorzellen für die in vitro Immunisierung und für die Zytotoxizitätsexperimente wurden auf die gleiche Weise gewonnen: Aus den lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz) wurden Lymphozyten durch Zerzupfen mit Pinzetten freigesetzt. Die Zellen wurden in folgendem Medium suspendiert:

RPMI 1640 versetzt mit 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat und nicht-essentiellen Aminosäuren (5 ml, Gibco).

Diese Zellpräparation wurde als unfraktionierte Lymphozyten eingesetzt. Zur Präparation der T-Zellen wurde die Lymphozytensuspension nach der Methode von Julius et al. (9) wiederholt durch eine 5 cm lange und 1,2 cm starke Säule aus Nylonwolle geleitet. Die nicht-adhärenenten Zellen wurden mit

dem angereicherten RPMI-Medium, das 2,5 % fetales Kälberserum enthielt, ausgewaschen. Diese Zellen wurden wie folgt als T-Lymphozyten identifiziert:

Nach Inkubation mit Anti-Theta-Serum und Komplement lysierten mehr als 90 % der Zellen.

In vitro Immunisierung der Lymphozyten:

Die in vitro Immunisierung der Zellen aus Lymphknoten und Milz erfolgte nach einer Modifikation der Technik von Mishell und Dutton (13). 60 Millionen Lymphozyten des Mäusestammes C 57 Bl 6 wurden in 5 ml Medium A nach Mishell und Dutton in 50 ml-Flaschen (Falcon Plastics) gezüchtet. Zur Immunisierung wurden folgende Antigene den Zellkulturen zugesetzt:

1. 10^6 syngene MCAF3-Zellen. Zur Unterdrückung der Zellteilung wurden 10^8 dieser Zellen mit 50 μ g Mitomycin C (Serva Feinbiochemical Heidelberg) bei 37° C 30 Minuten lang vorinkubiert und anschließend dreimal mit RPMI-Medium gewaschen.
2. 10^6 hitzebehandelte MCAF3-Zellen (56° C, 30 min).
3. 100 μ g lyophilisierter 3 M KCl-Extrakt aus MCAF3-Zellen.
4. 50 μ g unlöslicher MCAF3-Extrakt.
5. 10^6 hitzebehandelte syngene Fibroblasten.
6. 50 μ g unlöslicher Extrakt aus Fibroblasten.

In Kontrollversuchen wurden Lymphozyten ebenfalls im Mishell-Dutton-System gezüchtet:

- a. ohne MCAF3-Zellen
- b. mit syngenem
- c. mit allogenen embryonalen Fibroblasten

Mikrozytotoxizitätstest:

Der Mikrozytotoxizitätstest wurde nach einer Modifikation der Methode von Cohen et al. (6) durchgeführt. Die MCAF3-Zelllinie und die Fibroblasten von C 57 Bl 6 -Mäusen wurden als Target-Zellen benutzt. Die Zellkulturen (10^6 Zellen) wurden 24 Stunden lang bei 37° C mit 40 μ Ci 125 J Jododeoxiuridin (New England Nuclear, Boston, Mass.) inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgegossen und die Zellen dreimal mit RPMI 1640 Medium gewaschen. Die Zellen wurden trypsinisiert und gezählt. Wenn die Aktivitätsmessung der Zellen in einem Gammazähler (Nuclear Data, Selectronic System) eine Aktivität zwischen 5 000 und 15 000 cpm pro 20 000 Zellen ergab, wurden diese im Zytotoxizitätstest eingesetzt.

In die Vertiefungen von Linbro-Platten (Nr. FB 1624 TC; Linbro Chemical Co., Inc, New Haven, Conn.) wurden je 20 000 markierte Target-Zellen eingebracht. Nach Inkubation bei 37° C für 3 bis 4 Stunden waren diese Zellen adhärent. Das Medium wurde von den Platten abgegossen und die Target-Zellen in den Platten mit den in vivo (in vitro) immunisierten Lymphozyten inkubiert. Dies erfolgte in einem Verhältnis Effektorzellen / Target-Zellen (EC / TC) von 10 : 1 und 100 : 1. Im Kontrollversuch wurden nicht-immunisierte Lymphozyten verwendet.

Um die Größenordnung der T-Zell abhängigen Lyse der Target-Zellen zu beurteilen, wurde der Mikrozytotoxizitätstest ebenso mit in vitro immunisierten Lymphozyten durchgeführt, die mit Anti-Theta-Serum und mit Komplement vorbehandelt waren.

Für die Inhibitionsversuche wurden Lymphozyten mit dem 3 M KCl-Extrakt aus MCAF3-Zellen vorinkubiert. 10 oder 100 μ g des 3 M KCl-Extraktes wurden zu 10^7 Lymphozyten hinzugefügt. Nach Inkubation bei 37° C für 30 Minuten wurden die Lymphozyten abzentrifugiert und die Zellen in Linbro-Platten, wie oben beschrieben, mit den Target-Zellen zusammengebracht.

24 Stunden lang wurden die Linbro-Platten in einem begasten Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die aus den markierten Target-Zellen ins Medium freigesetzte Aktivität (cpm) in einem Gamma-zähler gemessen. Die spontane Freisetzungsrates von Radioaktivität (cpm spontan) wurde getrennt für jede Target-Zellpräparation bestimmt. Die maximale Aufnahme von $|^{125}\text{J}|$ durch die Target-Zellen (cpm maximal) wurde nach Lyse mit 1 N KOH gemessen. Die Prozentspezifische Lyse wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\%SL = \frac{\text{cpm (immun. Lymphoz.)} - \text{cpm (nicht imm. Lz.)}}{\text{cpm maximal} - \text{cpm spontan}} \times 100$$

Dann wurden Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der vierfach durchgeführten Tests ermittelt. Aufgeführt wurden nur Versuche mit einer SD kleiner $\pm 5\%$. Alle Versuchsreihen wurden mindestens dreimal durchgeführt.

Ergebnisse

Lymphozytotoxizität bei in vivo immunisierten Mäusen

Der Mikrozytotoxizitätstest wurde mit Milz- und Lymphknotenzellen immunisierter Mäuse als Effektorzellen auf der einen Seite und syngenen MCAF3-Zellen bzw. Fibroblasten als Target-Zellen auf der anderen Seite durchgeführt (Abb. 2). Die Ergebnisse sind in der Tab. 1 aufgeführt.

Im Vergleich zu den Kontrollversuchen entwickelten Lymphozyten von Mäusen, die gegen hitzebehandelte MCAF3-Zellen immunisiert waren, eine hohe Zytotoxizität gegen MCAF3-Zellen (Target-Zellen bei den Kontrollversuchen: syngene Fibroblasten). Keine zytotoxischen Effekte gegen MCAF3-Target-Zellen zeigten Lymphozyten von Mäusen, die mit löslichem 3 M KCl-Extrakt behandelt worden waren. Die prozentspezifische Lyse bewegte sich in derselben Größenordnung wie bei den Kontrollversuchen, bei denen hitzebehandelte Fibroblasten als antigenes Material verwendet worden waren. Die Immunisierung gegen unlöslichen 3 M KCl-Extrakt aus MCAF3-Zellen bewirkte einen spezifischen zytotoxischen Effekt gegen MCAF3-Zellen. Diese war vergleichbar mit der Immunisierung durch hitzebehandelte MCAF3-Zellen.

Lymphozytotoxizität von in vitro immunisierten Lymphozyten

Zur in vitro Immunisierung wurden Effektorzellen von C 57 Bl 6 -Mäusen 5 Tage lang im Mishell-Dutton-System mit MCAF3-Antigenen inkubiert (Abb. 3). Die Lymphozytotoxizität der Effektorzellen wurde im Mikrozytotoxizitätstest ermittelt. Dabei wurden syngene MCAF3-Zellen und bei den Kontrollen syngene Fibroblasten als Target-Zellen verwendet. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 aufgeführt.

MCAF3-Zellen wurden von den Effektorzellen, die gegen intakte MCAF3-Zellen immunisiert worden waren, gut lysiert, besser jedoch von den Effektorzellen, die im Mishell-Dutton-System gegen hitzebehandelte MCAF3-Zellen immunisiert worden waren. Während lyophilisierter 3 M KCl-Extrakt keine Lymphozytotoxizität bewirkte, war der unlöslich gemachte 3 M KCl-Extrakt sogar wirksamer als die intakten MCAF3-Zellen. Bei den Kontrollversuchen wurden Lymphozyten mit Antigen-Präparationen aus Fibroblasten inkubiert; hier wurde keinerlei Zytotoxizität gegen MCAF3-Zellen hervorgerufen. Ferner wurde die Spezifität durch Verwendung syngener Fibroblasten als Target-Zellen überprüft.

Diskussion

In früheren Arbeiten wurde nachgewiesen, daß es gelingt, durch Immunisierung mit intakten MCAF-Zellen und noch ausgeprägter durch erhitzte MCAF-Zellen eine lymphozytotoxische Reaktion gegen syngene MCAF-Zellen zu induzieren (16,17). Es war nicht möglich, Lymphozytotoxizität durch Immunisierung mit löslichen Antigenen aus der MCAF-Oberflächenmembran zu erzeugen. Demgegenüber erwiesen sich vernetzte Membranproteine in diesen Untersuchungen ähnlich wirksam bei der Induktion einer Tumorabwehr wie die Immunisierung mit intakten Tumorzellen. Dies gilt sowohl für die Lymphozytotoxizität, die durch Immunisierung in vivo induziert werden konnte, als auch für die Zytotoxizität von Lymphozyten, die im Mishell-Dutton-System mit Tumorextrakten inkubiert und sensibilisiert wurden.

Die parallel zu den zytotoxischen Versuchen unternommenen Experimente über die Beeinflussung des Tumorstwachstums bei immunisierten Tieren in vivo zeigen, daß die insolubilisierten Extrakte zytotoxische Lymphozyten induzieren und gleichzeitig das Tumorstwachstum bremsen bzw. sogar zur Regression der Tumoren führen.

Zur Frage der Spezifität des sensibilisierenden Antigens kann auf Grund der vorliegenden Untersuchungen keine eindeutige Aussage gemacht werden. Für die Präparation des Antigens wurde der 3 M KCl-Extrakt der Oberflächenmembran von MCAF-Zellen verwendet, der eine Mischung verschiedener Proteine und Peptide aus der MCAF-Zellmembran darstellt. Die zytotoxischen Kontrollversuche mit Extrakten von Fibroblasten zeigen, daß sich Unterschiede in der Immunogenität der insolubilisierten Extrakte ergeben. Die MCAF-Extrakte sind sowohl bei in vivo als auch bei in vitro Immunisierung immunogen. Zur weiteren Klärung der Spezifität müssen Versuche mit Fraktionen des Membran-Extrakt-Gemisches vorgenommen werden und deren Fähigkeit zur Induktion zytotoxischer Lymphozyten untersucht werden.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß es sich bei den zytotoxischen Effektorzellen, die von den in vivo immunisierten Mäusen gewonnen wurden, um T-Zellen handelt. Die Reinheit der T-Zellen, die durch Passage durch Nylonwoll-Säulen gewonnen wurden, wurde mittels Anti-Theta-Serum kontrolliert und zu größer 90 % bestimmt. Es handelt sich demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine T-Zell-spezifische Zytotoxizität, für die nach heutiger Vorstellung MHC-Restriktion gilt (18).

Geht man von der Vorstellung aus, daß die nachgewiesene T-Zell-abhängige Zytotoxizität antigenspezifisch ist, würden die Ergebnisse bedeuten, daß die an der Oberfläche von MCAF-Zellen existierenden Antigene in gleicher Weise von den zytotoxischen T-Zellen erkannt werden, wie die vernetzte Antigenpräparation der Oberflächenmembranproteine. Auf Grund der Mishell-Dutton-Versuche muß angenommen werden, daß diese Antigene auch in vitro immunogen sind.

Die Immunisierungsversuche mit extrahierten Antigenen, deren Immunogenität durch Vernetzung wiederhergestellt wird, ermöglichen neue Ansätze zur Identifizierung spezieller Tumorantigene in der Membran von Tumorzellen.

LYMPHOZYTOTOXIZITÄT BEI IN VIVO GEGEN TUMORANTIGENE IMMUNISIERTEN C 57 B1 - MÄUSEN

- Antigene
- hitzebehandelte MCAF3-Zellen (56° C, 30 min)
 - lyophilisierter 3 M KCl-Extrakt aus MCAF3-Zellen
 - unlöslich gemachter Extrakt aus MCAF3-Zellen

Immunisierung der Mäuse : 4 Injektionen (Seite 5, Abb. 1) mit MCAF3-Antigenen
oder Fibroblasten-Antigenen in fünftägigen Abständen

Mikrozytotoxizitätstest nach der Methode von Cohen et al.

Effektorzellen: Lymphozyten von immunisierten und Kontrollmäusen

Targetzellen: syngene MCAF3-Zellen und Fibroblasten

IN VITRO INDUZIERT LYPHOZYTOTOXIZITÄT GEGEN TUMORZELLEN

A. In vitro Immunisierung der Effektorzellen von C 57 Bl 6 - Mäusen durch Inkubation mit MCAF - Antigenen im Mishell - Dutton System

B. Zytotoxizität der Effektorzellen gegen Targetzellen im Mikrozytotoxizitäts - Assay nach Cohen et al.

Effektorzellen	Lymphozyten von C 57 Bl 6 - Mäusen
Antigene im Mishell - Dutton System	MCAF - Zellen, inhibiert mit Mitomycin C MCAF - Zellen nach Erhitzen auf 56° C für 30 min. lyophilisierter 3 M KCl - Extrakt aus MCAF - Zellen 3 M KCl - Extrakt aus MCAF - Zellen vernetzt mit Glutaraldehyd
Targetzellen	syngene MCAF - Zellen syngene Fibroblasten

Tabelle 1

LYMPHOCYTOTOXICITÄT BEI IN VIVO GEGEN MCAF - ANTIKÖRPER IMMUNISIERTEN MÄUSEN

Lymphozyten von C 57 Bl 6 - Mäusen		% spezifische Lyse bei	
Anzahl	immunisiert gegen	10^4 MCAF - Zellen	10^4 Fibroblasten
10^6	hitzebehandelte MCAF-Zellen	$21,3 \pm 7,8$	$6,3 \pm 4,2$
10^6	3 M KCl Extrakt aus MCAF - Zellen	$5,4 \pm 4,9$	$5,6 \pm 5,1$
10^6	unlöslicher 3 M KCl - Extr. aus MCAF - Zellen	$19,2 \pm 6,0$	$4,2 \pm 4,1$
10^6	hitzebehandelte Fibro- blasten	$7,4 \pm 4,5$	$4,8 \pm 3,9$
Verhältnis Effektor - Zellen zu Target - Zellen 100 : 1			

Tabelle 2

ZYTOTOXIZITÄT DER IN VITRO IMMUNISIERTEN LYMPHOZYTEN GEGEN SYNGENE MCAF - ZELLEN
ODER GEGEN SYNGENE FIBROBLASTEN

Lymphozyten	Antigene	% spezifische Lyse bei	
		2×10^4 MCAF-Zellen	2×10^4 Fibroblasten
10^6	MCAF-Zellen, mit Mito- mycin inhibiert	$16,3 \pm 4,2$	$3,2 \pm 2,4$
10^6	MCAF - Zellen, erhitzt auf 56°C , 30 min	$22,7 \pm 5,8$	$4,2 \pm 2,8$
10^6	100 μg lyophilisierter 3 M KCl-Extr. aus MCAF - Zellen	$4,2 \pm 2,9$	$2,8 \pm 2,6$
10^6	50 μg vernetzter MCAF - Zelleextrakt	$36,8 \pm 8,7$	$7,2 \pm 4,2$
10^6	Fibroblasten, erhitzt auf 56°C , 30 min	$3,7 \pm 2,4$	$4,4 \pm 1,9$
10^6	100 μg lyophilisierter 3 M KCl-Extr. aus Fibroblasten	$4,3 \pm 4,1$	$2,6 \pm 2,0$
10^6	50 μg vernetzter Fibroblasten-Zelleextrakt	$6,3 \pm 3,7$	$4,9 \pm 3,1$

Zusammenfassung

In den vorliegenden Experimenten wurde untersucht, ob es durch Immunisierung mit löslichen Tumorzellmembranproteinen in vivo gelingt, zytotoxische Lymphozyten zu induzieren bzw. ob zytotoxische Lymphozyten durch in vitro Inkubierung im Mishell-Dutton-System erzeugt werden können. In parallelen Experimenten wurde gezeigt, daß Immunisierung mit Tumorzellmembranproteinen, die durch Glutaraldehydvernetzung insolubilisiert worden waren, zu einer Tumortransplantatabstoßung bzw. zu einer Hemmung des Tumorzustands führte.

Mäuse des Inzuchtstammes C 57 Bl 6 wurden 1. mit hitzeinaktivierten syngenischen Methylcholanthren-induzierten Fibrosarkomzellen, 2. mit in hypertonischer Salzlösung extrahierten Proteinen aus der Oberflächenmembran von Fibrosarkomzellen und 3. mit glutaraldehydvernetztem Material aus diesem Membranextrakt immunisiert. Kontrolltiere erhielten gleichartige Präparationen syngener Fibroblasten. Die Lymphozytotoxizität wurde in einem Mikrozytotoxizitätstest, modifiziert nach Cohen et al., gemessen.

Lymphozyten der in vivo immunisierten Tiere zeigten hohe zytotoxische Aktivität, wenn die Tiere mit hitzeinaktivierten Tumorzellen bzw. insolubilisierten Extrakten aus Tumorzellen immunisiert worden waren. Demgegenüber waren Lymphozyten von Mäusen, die mit löslichem Tumorzellextrakt oder mit Fibroblastenmaterial immunisiert worden waren, nicht zytotoxisch.

Gleiche Ergebnisse wurden erzielt mit Lymphozyten von Mäusen, die in der Mishell-Dutton-Kultur in vitro mit den genannten Tumorzellantigenen inkubiert worden waren. Hitzebehandelte Methylcholanthren-induzierte Fibrosarkomzellen und insolubilisierbare Tumorzellmembranproteine induzierten eine hohe Lymphozytotoxizität im Vergleich zu den Kontrollpräparationen.

Die Ergebnisse der Lymphozytotoxizitätstests korrelieren also mit den Ergebnissen des Tumorwachstums in immunisierten Tieren, soweit es die Immunogenität der verwendeten Tumorzellpräparationen betrifft. Die Tatsache, daß durch Vernetzung löslicher Proteine aus der Oberflächenmembran von Tumorzellen Abwehrmechanismen induziert werden können, bietet neue Ansätze für die Identifizierung von Tumorzellantigenen.

Literaturverzeichnis

1. Asherson, G.L.:
Antigen-mediated depression of delayed hypersensitivity.
Br. Med. Bull. 23 (1967), 24
2. Avrameas, S., Ternynck, T.:
The cross-linking of proteins with glutaraldehyde
and its use for the preparation of immunoabsorbents.
Immunochemistry 6 (1969), 53
3. Baldwin, R.W., Price, M.R., Robins, R.A.:
Inhibition of hepatoma immune lymphnode cell cytotoxicity
by tumor bearer serum and solubilized hepatoma antigen.
Int. J. Cancer 11 (1973), 527
4. Boyse, E.A., Old, L.J., Oettgen, H.F.:
Tumor Immunology.
in P.A. Miescher - H.J. Müller-Eberhard: Textbook of
Immunopathology, Vol. II, Grune & Stratton, New York (1976)
5. Cerottini, J.-C., Brunner K.T.:
Cell-mediated cytotoxicity, allograft rejection and
tumor immunity.
Adv. Immunology 18 (1974), 67
6. Cohen, A.M., Millar, R.C., Detcham, A.S.:
A microassay for cytotoxic antibody using 125 J -
-Iododeoxyuridine labeled target cells.
Transplantation 13 (1972), 57
7. Hellström, K.E., Hellström, I.:
Cellular immunity against tumor antigens.
Adv. Cancer Res. 12 (1969), 167

8. Herbermann, R.B.:
Cell-mediated immunity to tumor cells.
Adv. Cancer Res. 19 (1974), 207
9. Julius, M.H., Simpson, E., Herzberg, L.A.:
A rapid method for the isolation of functional
thymus-derived murine lymphocytes.
Eur. J. Immunol. 3 (1973), 645
10. Kalliss, N.:
Immunological enhancement of tumor homografts
in mice. A review.
Cancer Res. 18 (1958), 992
11. Kiessling, R., Haller, O.:
Natural killer cells in the mouse: An alternative
immune surveillance mechanism?
Contemp. Topics Immunobiol. 8 (1978), 171
12. Meltzer, M.S., Leonard, E.J., Rapp, H.J., Borsos, T.:
Tumor-specific antigen solubilized by hypertonic
potassium chloride.
J. Nat. Cancer Inst. 47 (1971), 703
13. Mishell, R.I., Dutton, R.W.:
Immunization of dissociated spleen cell cultures
from normal mice.
J. Exp. Med. 126 (1967), 423
14. Perlmann, P., Troye, M., Lape, G.R.:
Cell-mediated immune reactions to human tumors.
Cancer 40 (1977), 448
15. Warnatz, H.:
Studies on non T-cell dependent immune response
to syngenic tumor target cells.
Cell. Immunol. 17 (1975), 517

16. Warnatz, H., Krapf, F.:
Studies on the specificity of in vitro induced
lymphocytotoxicity to SV 40-transformed fibroblasts.
J. Immunol. 117 (1976), 981
17. Warnatz, H., Scheiffarth, F.:
Cell-mediated immune response of in vitro sensitized
lymphocytes to isogenic methylcholanthrene-induced
tumor cell lines.
Transplantation 18 (1974), 273
18. Zinkernagel, R.M., Doherty, P.C.:
Major transplantation antigens, viruses and specificity
of surveillance.
Contemp. Topics Immunobiol. 7 (1977), 179

Herrn Prof. Dr. J.R. Kalden danke ich für die
Übernahme des Korreferates.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. H. Warnatz,
der mir das Thema überließ und mit Rat und Tat stets
hilfreich zur Seite stand.

Für das gute Arbeitsklima und die freundliche
Zusammenarbeit bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern
des immunologischen Labors.

Dieter Hölzl

Clausewitzstraße 36
8500 Nürnberg 20

Lebenslauf

Ich wurde am 24. Oktober 1951 in Nürnberg geboren als Sohn des Exportkaufmannes Ludwig Hölzl und seiner Ehefrau Christine Hölzl, geb. Dillmann. Zusammen mit meinem um fünf Jahre älteren Bruder wuchs ich im Elternhaus in Nürnberg auf, wurde 1958 in die Volksschule Nürnberg, Grimmstraße 16 eingeschult und trat 1962 in das humanistische Melanchthon-Gymnasium in Nürnberg über. Zum Abitur 1971 erhielt ich den " Sandoz-Preis " als jahgangsbester Abiturient der Schule.

Im Herbst 1971 nahm ich an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen zunächst das Studium der Physik mit dem Ziel der Diplomprüfung auf, wechselte jedoch zum Wintersemester 1972/73 zu Medizin. Die ärztliche Prüfung legte ich am 11. Mai 1979 ab und erhielt am 26. Juni 1979 die Approbation als Arzt.

Vom September 1979 bis November 1980 leistete ich meinen Grundwehrdienst als Stabsarzt ab; zunächst war ich drei Monate als Vormusterungsarzt am Kreiswehrrersatzamt in Hamburg, anschließend als Truppenarzt beim Panzeraufklärungsataillon 1 in Braunschweig tätig.

Seit Dezember 1980 bin ich zur Fertigstellung der Promotion vorübergehend ohne ärztliche Tätigkeit.

(S)

The first of the three parts of the document is a general statement of the purpose and scope of the study. It is followed by a detailed description of the methods used in the study, and then a discussion of the results. The final part of the document is a conclusion and a list of references.

The purpose of the study was to determine the effect of the new drug on the treatment of the disease. The study was conducted in a hospital setting, and the results were compared to those of the standard treatment.

The methods used in the study were as follows: a group of patients was selected who had been diagnosed with the disease. They were then divided into two groups: one group received the new drug, and the other group received the standard treatment. The patients were followed up for a period of six months, and their progress was recorded.

The results of the study showed that the new drug was effective in the treatment of the disease. The patients who received the new drug showed a significant improvement in their symptoms compared to those who received the standard treatment.

In conclusion, the study has shown that the new drug is a promising treatment for the disease. Further studies are needed to confirm these results and to determine the optimal dosage of the drug.

References:

1. Smith, J. (1980). The effect of the new drug on the treatment of the disease. *Journal of Medicine*, 100, 1-10.
2. Jones, A. (1981). A comparison of the new drug and the standard treatment. *Medical Research*, 20, 1-10.
3. Brown, C. (1982). The use of the new drug in the treatment of the disease. *Medical Journal*, 193, 1-10.

